

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BC

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

2 720 069

(21) N° d'enregistrement national :

94 06135

(51) Int Cl^e : C 07 K 14/475, 1/04, C 12 N 15/12, 15/85, 5/10, A 61 K
 38/18

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19.05.94.

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
 ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) —
 FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Rosa Frédéric et Wittbrodt Joachim.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : 24.11.95 Bulletin 95/47.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
 présent fascicule.

(74) Mandataire : Cabinet Armengaud Ainé.

(54) Dérivés de facteurs de croissance et d'hormones de la superfamille des TGFB, procédé pour leur obtention
 et leurs applications biologiques.

(57) Les dérivés de l'invention sont des variants des pro-
 duits de type sauvage comportant, dans la partie C-
 terminale, une ou plusieurs altérations, délétions et/ou mu-
 tations, leur conférant des propriétés inhibitrices vis-à-vis
 des produits de type sauvage. Ces variants sont utiles no-
 tamment comme inhibiteurs des facteurs de croissance et
 hormones correspondants naturels.

FR 2 720 069 - A1



DERIVES DE FACTEURS DE CROISSANCE ET D'HORMONES DE LA SUPERFAMILLE DES TGF β , PROCEDE POUR LEUR OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

- 5 L'invention a pour objet des dérivés de facteurs de croissance et d'hormones membres de la superfamille des protéines "Transforming Growth Factor Beta" (TGF β), leur procédé d'obtention et leurs applications biologiques.
- 10 La superfamille des TGF β regroupe de nombreux membres, initialement isolés grâce à l'activité des différentes hormones/facteurs de croissance.
- 15 Chaque membre peut être classé dans une sous-famille et possède en général plusieurs activités.
- 15 Les TGF β , au nombre d'au moins 5, sont capables notamment de stimuler la croissance en milieu géliifié, en présence d'EGF (Epidermal Growth Factor), de certaines lignées fibroblastiques, d'inhiber la croissance d'autres lignées, de faciliter le processus de cicatrisation et
- 20 20 d'avoir une activité chimiotactique vis-à-vis des macrophages.
- 25 25 Les activines stimulent la sécrétion de l'hormone FSH par l'hypophyse, mais aussi la différenciation érythrocytaire in vitro, la formation de mésoderme chez les Amphibiens et permettent la survie neuronale in vitro.
- 25 30 Les inhibines inhibent la sécrétion de FSH (follicle stimulating hormone), mais surtout agissent comme des supresseurs de tumeur chez la souris.
- 30 30 Les protéines BMP (Bone Morphogenesis proteins) induisent la formation de cartilage et d'os quand on les implante sous la peau, ont également une activité chimiotactique vis-à-vis des macrophages et stimulent la formation du mésoderme chez les Amphibiens.

L'hormone anti-mullérienne (MIS) induit la régression des voies génitales femelles chez les Mammifères et les oiseaux mâles.

5 D'autres membres existent comme le gène nodal, impliqué dans le développement précoce de la souris, certains gènes de Drosophile (gène DPP), de Xénopes (gènes Vg ou DVR), ou de poulet (dorsaline).

10 Le regroupement dans la superfamille vient du fait que toutes ces protéines ont un fort degré d'homologie, c'est-à-dire de ressemblance, dans les 120 à 130 acides aminés de leur partie C-terminale. En particulier, cette partie C-terminale, qui correspond à la partie active, comporte pour la plupart 7 cystéines que l'on peut aligner entre les différents membres, et 15 d'autres résidus consensus à des positions précises. Par exemple, l'avant-dernier acide aminé est toujours une cystéine, ainsi que le quatrième acide aminé en partant de l'extrémité terminale.

20 Dans le cadre de travaux sur l'étude du rôle de l'activine dans le développement d'embryons, en utilisant comme modèle expérimental le poisson, les inventeurs ont construit de nouveaux dérivés agissant comme variants dominants négatifs.

25 L'invention a donc pour but de fournir de tels dérivés qui sont des variants des produits naturels ou de type sauvage.

30 Elle vise également un procédé permettant de produire ces variants, en particulier de les construire par recombinaison génétique ou de les obtenir par voie de synthèse.

L'invention vise en outre les applications biologiques de ces variants.

Les dérivés selon l'invention de facteurs de croissance et d'hormones de la superfamille des TGF β sont

5 caractérisés en ce qu'il s'agit de variants des produits de type sauvage comportant, dans la partie C-terminale, une ou plusieurs altérations, délétions et/ou mutations, leur conférant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des produits de type sauvage.

10 On observera que, du fait des altérations effectuées dans la partie C-terminale, ces variants ne présentent plus l'activité biologique des produits naturels, mais sont toutefois capables d'inhiber l'activité de ces derniers in vitro et in vivo, et ce de manière spécifique.

15 L'invention vise en particulier les variants de facteurs de croissance et d'hormones du groupe comprenant les TGF β , activines, protéines BMP, inhibines, hormones antimullériennes, dorsalines.

Ces facteurs de croissance et hormones sont d'origine animale ou humaine.

20 De manière préférée, ces variants sont dépourvus de la partie N-terminale. Ils correspondent donc à tout ou partie de la région C-terminale des produits de type sauvage, c'est-à-dire la région sécrétée, celle-ci étant toutefois altérée dans les variants comme indiqué ci-dessus.

25 Selon une disposition avantageuse de l'invention, l'altération, mutation et/ou délétion, de la partie C-terminale concerne au moins un acide aminé conservé dans tous les membres de la superfamille, ou tout au moins dans pratiquement tous les membres.

30 Cet acide aminé se trouve plus spécialement dans la région qui pourrait être impliquée pour les membres de la superfamille dans l'activation du récepteur ou pourrait être requise pour le couplage de fonctions de liaison et d'activation.

Des variants selon cette disposition comportent ainsi une altération affectant un groupe phénylalanine du produit de type sauvage.

5 De manière préférée, le motif phénylalanine est remplacé par un motif isoleucine, alanine ou sérine ou, en variante est délété.

On citera des variants d'activine βA , βB ou βAB dans lesquels le motif phénylalanine est remplacé par un motif isoleucine.

10 Dans l'activine de poisson βB , le motif phénylalanine altéré occupe la position 21.

On rappelle que les activines actives se présentent sous forme d'homo ou d'hétéro-dimères formés après dimérisation de deux chaînes communes d'activine β , 15 comme représenté sur la figure 2.

L'invention vise également les clones d'ADN et d'ARNm capables de coder ou de transcrire pour les séquences d'acides aminés des variants définis ci-dessus.

20 Les séquences de ces ADN et ARN sont caractérisées en ce qu'elles comportent au moins un codon délété ou muté par rapport aux séquences codant pour les hormones et facteurs de croissance de type sauvage.

25 Le ou les codons mutés ou délétés sont tels qu'ils codent pour un ou des acides aminés conférant à la protéine correspondante des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la protéine naturelle.

30 L'invention vise également les séquences de nucléotides caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider avec celles portant l'information génétique pour coder pour les variants de l'invention et qu'elles portent l'information génétique pour un variant de membres de la superfamille ayant les propriétés inhibitrices soulignées ci-dessus.

Par l'expression "capables de s'hybrider", on se réfère aux conditions d'hybridation classiques, de préférence aux conditions d'hybridation dans lesquelles la valeur de T_m est de l'ordre de 60°C en milieu 15 mM [Na⁺]. Ces conditions d'hybridation sont le plus généralement des conditions stringentes, avec l'utilisation d'une température de l'ordre de 50°C .

5

Entrent également dans le cadre de l'invention, les séquences de nucléotides résultant de la dégénération du code génétique et qui codent pour les variants définis ci-dessus.

10

L'invention vise notamment les séquences des gènes codant pour la partie C-terminale des activines, βB βA ou βAB , tel que clonés par PCR à partir d'une banque d'ADN génomique d'une espèce donnée et comportant un ou plusieurs acides aminés mutés ou délétés.

15

L'invention vise en particulier la séquence d'ADN capable de coder pour la partie C-terminale de l'activine βB , et comportant un codon ATC codant pour une isoleucine en remplacement du codon TTC codant pour une phénylalanine.

20

Elle vise également tout spécialement les ARN m correspondants.

25

Les constructions de vecteurs recombinants d'expression ou de transcription font également partie de l'invention.

30

Ces constructions sont caractérisées en ce qu'elles renferment au moins une partie des séquences d'ADN définies ci-dessus sous le contrôle d'un promoteur approprié.

De même, l'invention vise les cellules hôtes transformées par ces constructions. Il s'agit le plus généralement de cellules d'eucaryotes, de procaryotes ou

de bactéries. On citera un système de haute expression comme le virus de la vaccine.

L'invention a également pour objet un procédé de production des variants définis ci-dessus.

5 Ces variants peuvent être obtenus selon des méthodes classiques de synthèse peptidique en établissant une séquence en acides aminés, plus spécialement de la seule partie C-terminale ou d'une portion de celle-ci, selon la séquence de l'hormone ou du facteur de croissance naturel, et en modifiant ou en délétant à 10 l'endroit souhaité un ou plusieurs des acides aminés.

15 Les variants de l'invention peuvent être également produits par recombinaison génétique en transformant des cellules hôtes à l'aide des constructions de vecteurs d'expression évoquées plus haut et en établissant les conditions de culture appropriées de ces cellules hôtes de manière à obtenir une expression du variant, qui sera ensuite isolé du milieu.

20 On procède par exemple comme suit en insérant l'ADNc d'un variant dans un plasmide, sous le contrôle d'un promoteur viral.

25 On utilise le fragment de restriction BspHI/Nsil de 1260 pb isolé de l'ADNc d'un variant (voir le fragment décrit dans les exemples en rapport avec l'activine β B de poisson). Ce fragment, éventuellement taggé afin d'être reconnu par un anticorps monoclonal (voir référence bibliographique (1) donnée en fin de description), est introduit dans un vecteur tel que le vecteur eucaryote PCMV5 au site EcoRI et PstI pour engendrer un plasmide du type appelé dans les exemples pC β B. Le plasmide est introduit, selon les techniques classiques, dans des cellules hôtes, par exemple des cellules eucaryotes. On citera des cellules humaines 30 comme les cellules COS.

Par culture de ces cellules, on produit le variant qu'on recueille dans le surnageant. Avec les cellules COS, on opère à environ 37°C pendant 60 heures.

Le milieu de culture dépourvu de sérum est prélevé et utilisé aux fins de purification. Cette étape de purification consiste par exemple en une chromatographie liquide sous haute pression en phase inverse (2). Lorsqu'on utilise des produits taggés, on fait réagir le surnageant avec un anticorps monoclonal pour obtenir le variant sous forme purifiée.

L'invention fournit ainsi les moyens d'obtenir des inhibiteurs spécifiques pour chacun des membres de la superfamille des TGF β .

Etant donné la large distribution des hormones et facteurs de croissance de cette superfamille et leur implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, les variants de l'invention présentent un grand intérêt dans de nombreuses applications.

Les exemples donnés ci-après, en utilisant comme modèle expérimental le poisson, mettent en évidence l'effet inhibiteur spécifique vis-à-vis de l'hormone naturelle d'une activine $\beta\beta$ mutée.

L'utilisation de ce variant permet d'élucider le rôle de l'activine durant les stades précoce de l'embryogénèse et tout spécialement le rôle de l'activine dans l'induction du mésoderme et la formation de l'axe *in vivo*. Comme le montrent les résultats obtenus, l'hormone mutée perturbe la formation du mésoderme et de l'axe d'une manière dose-dépendante.

D'autres travaux ont été effectués avec des hormones ou des facteurs de croissance mutés et/ou délétés sur des cellules de petits mammifères ou encore des cellules humaines, confirmant le pouvoir inhibiteur de ces produits vis-à-vis de ceux de type sauvage.

Ainsi des tests ont été effectués à l'aide de l'activine $\beta\beta$ mutée sur la différenciation érythroïde ou sur la phosphatase alcaline dans les ostéoblastes.

5 Les variants de l'invention constituent des outils de grand intérêt pour étudier les domaines d'activité des hormones et facteurs de croissance de la superfamille des TGF β .

10 Ils sont ainsi utilisables dans des études fonctionnelles et pharmacologiques.

15 Ils permettent en particulier l'étude des fonctions des hormones et facteurs de croissance dans un système physiologique donné, par analyse de toute perturbation introduite par l'utilisation du variant.

20 Ils sont également utilisables comme agents thérapeutiques des maladies dues à la surexpression d'une de ces hormones ou facteurs de croissance, par exemple dans des leucémies ou des maladies auto-immunes. A titre d'exemple, on citera à cet égard, le lien suggéré entre des néphropathies apparaissant lors de diabètes et la surexpression de TGF β au niveau du rein.

25 La surexpression de ces hormones peut être régulée et/ou contrôlée à l'aide de quantités appropriées et efficaces de variants.

30 Ces variants qui sont des protéines solubles (injectables), peuvent être administrés au patient selon les voies habituelles, par exemple intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse ou par injection sous-cutanée. Les formes d'administration et doses seront choisies selon le mode d'administration utilisé.

35 Les propriétés des variants de l'invention sont également mises avantageusement à profit pour inhiber l'expression de la FSH.

40 L'invention vise donc les compositions contraceptives correspondantes contenant une quantité efficace

de variant en association avec un excipient pharmacologiquement acceptable.

5 Ces compositions seront formulées et administrées selon une posologie déterminée, aux fins de contrôle de la reproduction, ou de stérilisation des animaux.

10 Les variants de l'invention constituent également des facteurs de contrôle de la régulation hormonale de la différenciation érythrocytaire.

15 Dans cette application, on administre les variants, en association avec un véhicule inerte, sous une forme et selon une posologie appropriées au traitement à effectuer.

15 D'autres applications encore comprennent l'utilisation des variants de l'invention pour bloquer la morphogénèse osseuse ou pour intervenir dans des processus cicatriciels.

20 Ils sont également utilisables comme modèles en culture cellulaire. On citera leur application pour contrôler la survie neuronale.

25 A titre d'exemples, pour illustrer l'invention, on rapporte ci-après des résultats de travaux effectués en utilisant comme modèle expérimental le médaka (*Oryzias latipes*), ou le danio (*Brachydanio rerio*), appelé ci-après le danio.

30 Ces travaux portent plus particulièrement sur l'élaboration de variants de l'activine $\beta\beta$, et l'isolement de séquences d'ADN et d'ARN codant pour ces variants.

30 Ils concernent également l'étude de leur activité et leur utilisation pour démontrer le rôle de l'activine maternelle comme inducteur dans la formation du mésoderme et de l'axe.

Ces résultats peuvent être aisément mis à profit par l'homme de l'art sur d'autres modèles expérimentaux et notamment de Vertébrés supérieurs. Plusieurs travaux montrent en effet que les facteurs et mécanismes impliqués dans l'induction embryonnaire chez le poisson sont similaires à ceux observés chez les vertébrés supérieurs.

Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 10, qui représentent respectivement :

- la figure 1, la partie C-terminale de séquences d'acides aminés d'activines de différentes espèces, déduites de fragments d'amplification par PCR,
- la figure 2, une représentation schématique d'une activine dimère,
- la figure 3, les résultats d'une analyse électrophorétique se rapportant aux protéines sécrétées à partir d'ovocytes de Xénope, après injection d'ARN de variant,
- la figure 4, une photo d'un transfert de Northern d'ARNm extraits de calottes de Xénope après incubation avec des surnageants de cultures infectées par l'ADN codant pour un variant selon l'invention ou pour le produit naturel correspondant,
- la figure 5, les courbes de l'expression relative de l'actine en fonction du pourcentage variant d'activine/activine naturelle,
- la figure 6, des photos montrant l'hybridation de l'ARN de calottes de Xénope, après incubation avec des milieux conditionnés pC β Bv et pC β Bs, avec de l'ARN de Mix.1 et une sonde pour l'ARN de Ef-1a,
- la figure 7, les courbes de l'expression relative de Mix.1 en fonction de dilutions d'activine β B,

- la figure 8, l'effet d'un variant de l'invention sur la différenciation de cellules SAOS induite par BMP-4,

5 - les figures 9A à 9F l'effet d'ARN de variant sur la formation de l'axe chez le médaka, et

- la figure 10A à 10P l'effet obtenu par injection d'ARN de variant sur des marqueurs d'expression de mésoderme et neuronaux chez des embryons de médaka.

MATERIELS ET METHODES :

10 **Amplification par PCR et clonage des produits de la PCR.**

On utilise des oligonucléotides modifiés, dégénérés.

L'amorce N-terminale est constituée par l'oligonucléotide :

15 5' GGI (CT) TI GA (AG) TG (CT) GA (CT) GG -3', et l'amorce C-terminale, par l'oligonucléotide :

5'- ICC (AG) CA (CT) TC (CT) TC IAC IAT -3'

L'amplification par PCR est réalisée sur 10 ng d'ADN génomique de médaka et de danio.

20 Le milieu réactionnel de 50 µl est constitué par :

1 x tampon (1 x = 1 fois concentré) ; 0,2 mM de chacun des composés suivants : dATP, dCTP, dGTP et dTTP ; 4 µM de chaque amorce et 2 U d'ADN polymérase Taq (tel que le produit commercialisé par Cetus).

25 Les réactions sont répétées 35 fois selon un cycle de 1 min. à 92°C, à 43°C et à 72°C dans une machine à PCR à effet Peltier.

30 Au cours des cycles 1 à 4, on augmente la température d'hybridation de 37°C à 43°C en ayant recours à des paliers de 37, 39, 41 et 43°C.

Après l'amplification, les réactions sont développées sur un gel 3 + 1% de NuSieve agarose R dans 1x TAE (TAE = tris acétate d'EDTA). Le produit de 350 pb

est découpé du gel, purifié et TA-cloné dans un vecteur PCR-1000 (Invitrogen).

Clonage de l'ADNc entier de l'activine β B de danio

On procède au criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir d'embryons de danio de 20 à 28 h. On utilise comme sonde l'activine β B de médaka.

On procède au séquençage d'un clone contenant 3,02 kb d'ADNc dans les deux directions par le biais de délétions induites par l'exonucléase III en utilisant un kit Séquénase R (USB)

Un fragment de 1260pb BspHI/Nsil contenant la région codante complète pour l'activine β B est sous-cloné dans les sites EcoRI et PstI du vecteur de transcription eucaryotique pCMV5 (3) qui contient une origine de réplication SV40 et le promoteur CMV.

On génère ainsi des plasmides pC β B comportant la région codante pour une activine β B.

Ces plasmides sont appelés ci-après pC β Bs lorsqu'ils renferment la région codant pour une activine de type de sauvage.

Lorsqu'on effectue le sous-clonage d'un fragment muté ou délétré selon l'invention, on obtient des plasmides appelés ci-après pC β Bv comportant la région codant pour un variant d'activine.

Pour vérifier l'activité des clones d'activines, des cellules COS sont transfectées selon la méthode au DEAE-Dextrane comme décrit par Sambrook et al (4).

Des cellules humaines 293 sont transfectées de manière stable à l'aide de constructions activine-pCMV et d'un plasmide portant un gène de résistance à la néomycine (pNEO β Gal, Stratagene) sous sélection G 418 comme décrit par Chen et al (5).

Un milieu DMEM dépourvu de sérum est conditionné par les cellules transfectées pendant 60 heures, puis utilisé sur des explants du pôle animal d'embryons de stade 8 de Xénope à une dilution de 1:4 dans 1xMMR.

Les cellules SAOS sont traitées avec un surnageant approprié. L'induction de phosphatase alcaline est réalisée dans des essais en quadruple comme décrit par Gray et al (6).

10 Mutagénèse dirigée sur un site, constructions de plasmides et transcriptions in vitro

On effectue une mutagénèse dirigée sur un site d'ADNC de l'activine β B dans un pBluescript R (Stratagène) en utilisant l'oligonucléotide à effet mutagène 5-TCG ACA TCC GGC TCA T-3. On opère selon Kunkel (7) à l'aide du kit de mutagénèse BioRad.

Le fragment de 1260 pb BspHI/Nsil mentionné ci-dessus est ligué dans pSP64T linéarisé par Bgl II.

15 Injection d'ARN dans des embryons à 2 cellules

On injecte environ 25 fg à 60 pg d'ARNm de variant dans un blastomère ou dans les deux au stade à deux cellules.

Pour les injections, les embryons sont maintenus dans un milieu physiologique (Ringer pour les médakas), à 18°C, fixés dans un puits d'agar.

L'ARN est dilué dans un tampon Ringer concentré 1 fois, contenant du rouge de phénol (0,1%) et 20 ng/ml d'ARN non poly-adénylé d'embryons de médaka de stade 15.

Après les injections, les embryons sont transférés dans un incubateur à 27°C et 12 heures après, le milieu est changé pour un milieu contenant 1 % de NaCl, 0,03 % de KCl, 0,04 % de CaCl₂, 0,16 % de MgSO₄ et 0,0001 % de bleu de méthylène.

Injection dans des ovocytes et analyse des protéines secrétées

En opérant comme décrit par Krieg et al. (8), on prépare des ovocytes de Xénope auxquels on injecte de 10 à 30 ng d'ARN de variant. On soumet 10 de ces ovocytes à un marquage court dans 50 µl de milieu OR2 avec 30 µCi de ^{35}S méthionine pendant 2 h.

Les ovocytes sont ensuite soumis à incubation une nuit dans du milieu OR2 frais.

Les surnageants sont analysés sur un gel de polyacrylamide à 12 % SDS-PAGE et traités pour une autoradiographie.

Analyse d'ARN

L'ARN total est extrait comme décrit par Sargent et al (9) et analysé par transfert de Northern ou par protection avec de la RNase selon les procédés standards (4).

Isolement et analyse par RT-PCR de l'ARN des variants

500 ng d'ARN total sont traités avec de l'ADNase, extraits à l'aide de phénol, précipités et soumis à une transcription inverse en utilisant une amorce d'oligonucléotide dT et 200 U de transcriptase inverse MoMuLV (Gibco-BRL). Les ADNC résultants sont amplifiés par PCR avec l'amorce 5' :

25 5-CGA CAC GGG GGC TTA - 3

et l'amorce 3' : 5-GTA GTA CAG CAT GGA CA-3, spécifiques pour l'activine $\beta\beta$ de médaka.

Le milieu de réaction (50 µl) est constitué par :

30 1 x tampon, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce et 0,1 U de Taq DNA polymérase (Stehelin). Les réactions sont réalisées en 25 cycles (92°C , 1 min, 52°C , 1 min et 72°C , 1 min), qui comprennent une première étape à 92°C sans Taq DNA polymérase.

Anticorps et immunohistochimie

Pour détecter la chorde dorsale dans les embryons de médaka, on utilise l'anticorps monoclonal MZ 15 (voir Zanetti et al, (10)) à une dilution de 10-3.

5

Un antisérum monoclonal formé contre l'homologue de danio de la protéine de Brachyurie de souris (protéine T) et dilué à $0,2 \times 10^{-4}$ pour détecter la protéine T de médaka.

10

Pour détecter N-CAM de médaka, on utilise l'anticorps monoclonal D-3 (11) qui donne une réaction croisée avec les molécules N-CAM (neuro cell adhesion molecule) de poisson rouge (12) à une dilution de 10-4.

15

Les embryons, dépourvus de chorions, sont fixés pour au moins 6 heures avec du paraformaldéhyde (4 %) dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4.

Histologie

20

Les embryons de médaka sont fixés durant environ 14 heures à température ambiante dans du paraformaldéhyde à 4 % dans 1 x PBS. Après avoir éliminé les chorions, les embryons sont déshydratés et traités selon les méthodes histologiques standards comportant la coloration avec de l'hématoxyline et de l'éosine.

RESULTATS

25

1) Isolement D'ADNC d'activine de poisson

Les techniques rapportées ci-dessus conduisent à l'isolement de l'ADNC de l'activine βB de danio et à l'obtention de fragments PCR correspondant à la partie C-terminale des chaînes d'activine de médaka et de danio.

30

Les séquences des peptides d'activine correspondant aux fragments PCR sont données sur la figure 1.

Sur cette figure, on compare la séquence de l'activine βB de mammifère (M), SEQ ID N° 1, avec celles, homologues des activines $\beta B1$ et $\beta B2$ de Xénope (X_1 et X_2),

respectivement SEQ ID N° 2 et N° 3, β B1 et β B2 de poisson rouge (R1 et R2), respectivement SEQ ID N° 4 et N° 5, de médaka (m) SEQ ID N° 6 et de danio (d), SEQ ID N° 7

5 Les blancs indiquent les acides aminés identiques, les espaces introduits pour un meilleur alignement sont représentés par un point.

Les régions codées par les amores PCR ne sont pas indiquées. L'ADNC cloné à partir du danio est identique à Zact β B.

10 La comparaison de ces séquences montre une identité de séquences à 92 % pour les activines β B de médaka et de danio.

15 On constate également une identité globale de 73 % (similarité de 87 %) de l'activine de danio avec celle de mammifère qui comprend tous les résidus conservés lors de l'évolution.

La protéine codée comprend un peptide signal pour la sécrétion.

20 La région tribasique précédant la partie C-terminale conservée doit servir comme site de processus protéolytique pour libérer le peptide actif carboxy terminal.

25 On rapporte sur la figure 2, une représentation schématique d'une activine sous forme dimère. La partie restante du précurseur est hachurée et la partie C-terminale active ombrée. La région de mutation du variant est indiquée par un cercle.

2) Mutagénèse

30 En appliquant la technique de mutagénèse, on remplace dans le fragment de 1260 bp d'ADNC de danio le codon TTC qui code pour la phénylalanine en position 21 de l'activine β B dans la partie C-terminale, par le codon ATC, qui code pour une isoleucine. On notera que le motif phénylalanine, conservé comme indiqué plus haut dans

toute la superfamille des TGF β , à l'exception des hormones anti-mullériennes, précède le premier domaine α -hélicoïdal considéré comme étant une partie de la surface d'interaction entre le ligand et le récepteur.

5 A moins d'indications contraires, le variant utilisé dans les essais rapportés ci-après correspond à ce variant d'activine β B comportant un motif isoleucine en position 21.

10 3) Analyse de l'activité in vitro du variant de l'activine

- étude des protéines sécrétées à partir d'ovocytes de Xénope.

15 L'ARN est transcrit à partir de plasmides pSP64T portant respectivement de l'ADNc d'activine du produit naturel du variant et injecté dans les ovocytes. Les ovocytes sont soumis à un marquage court en utilisant de la 35 S méthionine. Des quantités égales de surnageant sont analysées dans des conditions réductrices (red) et non réductrices (non red) sur un gel SDS-PAGE à 12 % et 20 autoradiographiées (voir figure 3).

La taille moléculaire des marqueurs (en kD) est indiquée sur la droite de la figure.

25 L'activine naturelle est sécrétée et traitée par l'ovocyte pour générer un peptide de 15 kD (C-terminal) et un peptide de 41 kD (restant du précurseur) dans des conditions réductrices comme décrit par Huylebroeck et al (11) pour l'activine sécrétée à partir de cellules de tissus en culture infectés par le virus de la vaccine.

30 Dans des conditions non réductrices, l'espèce de 15 kD est déplacée à 25 kD ce qui est en accord avec la structure dimère de l'activine.

- transfection de cellules COS et de cellules 293 à l'aide de pCMV5s et de pCMV5v.

On étudie l'effet de milieux conditionnés dérivés de ces cellules transfectées sur l'induction du mésoderme chez des explants de pôle animal de Xénope (calottes de Xénope).

5 On soumet à incubation des calottes de Xénope au stade 8 avec des surnageants de cellules transfectées selon le rapport indiqué avec pCMV5 (témoin), pC β B comportant la région codante de l'activine de type sauvage (ou pC β Bs), pC β B comportant la région codante de 10 l'activine du variant (ou pC β Bv).

L'incubation est poursuivie jusqu'au stade 17 de l'embryon témoin.

15 L'ARN est extrait des calottes animales selon la méthode de Sargent et al (7) et analysé par transfert de Northern avec une sonde d' α -actine. Comme témoin pour l'induction, on utilise le milieu XTC. Les symboles utilisés sont les suivants : V = variant ; s = produit de type sauvage.

20 L'autoradiographie est représentée sur la figure 4. Le milieu XTC correspond à la piste de droite. Dans la partie inférieure, on indique le témoin (filtre coloré avec du bleu de méthylène et de l'ARNn 18S).

25 La figure 5 donne les courbes de l'expression relative de l'actine en fonction du pourcentage variant d'activine/activine sauvage dans la co-transfection. La courbe --□-- correspond à une co-transfection avec pCMV5 + pC β Bs, et la courbe --■-- à une co-transfection avec pC β Bv + pC β Bs. Ces courbes représentent une moyenne de 3 expériences.

30 L'examen de ces résultats montre que les milieux conditionnés provenant de cellules co-transfектées avec les ADN de pC β Bs et pCMV5 (rapport 2:1) induisent fortement l'expression de l'actine cardiaque.

Le remplacement de pCMV5 par pC β Bv (selon le même rapport) conduit au contraire à une inhibition de l'expression de l'actine et à un faible allongement des calottes animales.

5 Lorsqu'on augmente la proportion de variant (plus de 50 %) dans la co-transfection, on obtient un surnageant dépourvu de toute activité inductrice du mésoderme. On observe au contraire une induction significative vis-à-vis du mésoderme avec le témoin correspondant.

10 Pour déterminer le niveau auquel le variant d'activine interfère avec l'activité de l'activine naturelle, on a mélangé des milieux de cellules transfectées avec soit pC β Bs, soit pC β Bv et testé leur activité sur l'induction de l'allongement des calottes animales ou l'ARN de Mix.1.

15 20 On prépare de l'ARN à partir de calottes animales incubées dans des milieux conditionnés de cellules 293 transfectées avec pC β Bs ou pC β Bv ou un mélange des surnageants. L'incubation est effectuée jusqu'au stade 10,5 du témoin (gastrula précoce).

25 Dans cette expérience, la concentration en surnageant du variant est maintenue constante et le surnageant est mélangé avec différentes dilutions du surnageant de cellules transfectées par pC β Bs.

30 L'ARN de 2 calottes est hybride avec une sonde d'ARN de Mix.1 et une sonde pour l'ARN de Ef-la. On effectue une protection avec une RNase comme décrit dans la partie "Méthodes" ci-dessus.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 6 où v = variant, s = produit de type sauvage et m = milieu témoin. Les parties supérieures et moyennes correspondent respectivement à une exposition longue

(6 h) et à une courte (16 h) du même gel (Mix.1). La partie inférieure montre l'expression de Ef.1a.

Sur la figure 7, on rapporte les courbes de l'expression relative Mix.1 en fonction de la dilution de l'activine β B. La courbe --○-- correspond aux expériences avec le milieu et pC β Bs, la courbe --◇-- à celles avec pC β Bv + pC β Bs, ■ à pC β Bv et ◆ au milieu témoin.

L'induction est appréciée par rapport à la quantité d'ARN de Ef-1a et exprimée par rapport à l'effet maximum observé lorsque les calottes ont été incubées avec du surnageant de cellules 293 transfectées par pC β B (activine sauvage et témoin).

La courbe représente une moyenne de deux expériences indépendantes.

On constate que le variant d'activine inhibe l'induction par l'activine β B.

La spécificité de l'interaction des variants d'activine avec l'activine naturelle a été analysée en utilisant un autre inducteur potentiel du mésoderme appartenant à la superfamille des TGF β , à savoir BMP-4 de Xénope. BMP-4 induit la différenciation des cellules de la lignée cellulaire de sarcome ostéogénique SAOS-2 *in vitro*.

Des cellules SAOS-2 sont mises à incuber pendant 36 h dans un milieu conditionné obtenu à partir de cellules COS co-transfектées avec une quantité constante d'ADN de variant ou de témoin (pCMV5). Les dilutions de BMP-4 sont indiquées sur la figure 8 (■ correspond au variant d'activine, ▨ à pCMV5, □ à BMP-4 et △ aux cellules non traitées).

En variante, les milieux conditionnés de cellules COS co-transfектées avec BMP-4 et les variants d'activine ou le témoin (pCMV5) sont mélangés et appliqués aux cellules SAOS dans des conditions

identiques. On utilise une quantité constante de variant de témoin et les dilutions indiquées de milieu conditionnés de BMP4. Les surnageants témoins proviennent de cellules COS transfectées respectivement avec pC β Bv, pCMVs ou de cellules non traitées.

L'activité de la phosphatase alcaline est donnée en fonction du plasmide utilisé.

La co-expression dans les cellules COS du variant d'activine avec BMP-4 de Xénope n'inhibe pas de manière significative la capacité d'induction de BMP-4 de Xénope vis-à-vis de la différenciation des cellules SAOS.

Lorsqu'on ajoute les surnageants de pC β Bv aux surnageants de cellules transfectées par BMP-4 de Xénope, on n'observe pas d'inhibition de la différenciation des cellules SAOS par BMP-4.

Les variants de l'invention exercent donc une activité spécifique de dominant négatif vis-à-vis de l'activine, mais n'interfèrent pas avec l'activité de BMP-4.

4) Utilisation de variants de l'invention pour étudier le rôle de l'activine in vivo.

. Effet de l'ARNm de variant sur la formation de l'axe chez le médaka

On rapporte ci-après les résultats d'expériences effectuées avec l'ARNm du variant mis en œuvre dans les essais ci-dessus.

Il s'agit dans ces expériences d'étudier le rôle de l'activine dans les processus d'induction du mésoderme et de formation de l'axe.

A cet effet, on injecte différentes quantités d'ARN du variant dans l'un des deux blastomères d'un embryon de médaka (plus de 1500 embryons ont été utilisés). Les embryons sont conservés à 28°C, puis 32 heures après les injections, on procède aux analyses

lorsque les témoins ont terminé la gastrulation et se trouvent au stade somite 12.

Les résultats obtenus sont donnés sur les figures 9A à 9F, où

5 - la figure 9A représente les calottes animales obtenues après injection de 500 fg d'ARN du variant,

- la figure 9B correspond à une coupe histologique des calottes de la figure 9A, montrant une structure de type blastula,

10 - la figure 9C montre le phénotype obtenu de manière prédominante avec un calotte avec structure et une structure de type somite (indiquée par la tête de la flèche) lorsqu'on injecte des quantités intermédiaires d'ARN de variant (100 fg)

15 - la figure 9D la perte des structures antérieures induite par l'injection de faibles quantités d'ARN du variant (25 fg),

- la figure 9E, représente, à titre de comparaison, un embryon témoin n'ayant pas reçu 20 d'injection, et

- la figure 9F une coupe transversale de la région du tronc de l'embryon témoin.

25 Dans les embryons qui reçoivent des quantités injectées élevées (500 fg) d'ARN de synthèse du variant, appelés embryons à taux élevé de variant, le phénotype observé est uniforme.

30 Après 32 heures, toutes les cellules de l'embryon sont localisées à un pôle de la membrane vitelline formant une calotte complètement non structurée.

Aucun axe évident n'apparaît formé comme le montre la figure 9A.

Par vidéo-microscopie, on constate que lorsque les témoins commencent à gastruler, les cellules des

blastulas à teneur élevée en variant ne montrent aucun mouvement évident de gastrulation. Les cellules de ces embryons sont encore vivantes, le bleu de méthylène contenu dans le milieu étant efficacement rejeté par les

5 embryons. Le taux d'embryons morts n'augmente pas de manière significative (figure 9A). L'analyse histologique révèle seulement deux types de cellules :

- une seule couche de cellules avec des noyaux plats couvrant le vitellus, et
- 10 - une région multicouche (la calotte) composée d'une population plutôt uniforme de cellules rappelant des blastomères non différenciés. (figure 9B).

La réduction de la quantité d'ARN du variant injectée (100 fg) conduit à un déplacement du phénotype

15 prédominant.

La plupart des embryons (55 %) forment alors quelques structures du type somites (figure 9C "calotte avec structure").

Bien qu'on n'observe aucun signe de formation propre de l'axe dans ces embryons, des dérivés du mésoderme comme les cellules de globules rouges sont observés de façon importante après une incubation à long terme des embryons avec le variant.

Les embryons dans lesquels on a injecté 25 fg d'ARN de variant (embryons à faible teneur en variant) expriment des structures morphologiques distinctes.

Le phénotype le plus important dans ce groupe (figure 9D) ("axe réduit", 48 % de tous les embryons ayant reçu une injection, figure 9A) contient un axe avec des défauts évidents dans la partie antérieure, tel qu'un manque de tête ou d'yeux et de cerveau à l'avant ou au milieu.

Une fraction mineure d'embryons à faible teneur en variant montre la formation de deux queues.

En résumé, l'injection d'ARN du variant conduit à une perte progressive, dose-dépendante, des structures axiales.

5 On observe une gamme plutôt étroite de phénotypes chez les embryons auxquels on a injecté une quantité donnée d'ARN.

. Effet de l'ARNm de variant sur l'expression de marqueurs du mésoderme et neuronaux chez le médaka

10 Pour affiner l'analyse phénotypique et histologique, on utilise des anticorps reconnaissant de manière spécifique les structures du mésoderme.

15 On effectue les analyses sur des embryons de médaka auxquels on injecte différentes quantités d'ARN de variant (voir les trois photos du bas de la figure 10 où la quantité injectée est indiquée sur la droite), ou bien sur lesquels on n'effectue aucune injection (voir les deux photos dans la partie supérieure). On récupère les embryons après 32 h à 28°C (les embryons ayant reçu des injections et les embryons témoins sont représentés sur les figures 9 D, E et F), ou après 24 h (figure 10A), 16 heures (figure 10B) ou 18 heures (figure 10C). Les embryons sont soumis à un traitement de fixation et traités pour immunocoloration avec les anticorps (indiqués en haut).

20 25 On utilise l'anticorps monoclonal MZ15 qui permet d'identifier la notochorde, dérivé dorsal du mésoderme.

30 Une coloration dans l'embryon de type sauvage est d'abord détectée après 24 heures dans la notochorde ombilical postérieure (figure 10A, D).

La protéine de brachyurie (protéine T), exprimée immédiatement lorsqu'on induit le mésoderme chez les amphibiens et le poisson, est utilisée comme marqueur général du mésoderme.

Son modèle d'expression dans les embryons de médaka de type sauvage (figure 9B, E), étudié avec un anti-sérum s'avère très voisine de celle décrite pour le danio.

5 Les embryons à teneur élevée en variant n'expriment pas de manière décelable d'antigène MZ15 ou de protéine T (figure 10G, H).

10 Dans les "calottes avec structure", les anticorps MZ15 et de protéine T marquent des cellules apparaissant dans une chorde reliée. Contrairement aux résultats obtenus avec des embryons normaux, cette coloration est presque exclusivement détectée à la surface de l'embryon plutôt qu'à l'intérieur (figure 10n, J, L), ce qui suggère que du mésoderme a été différencié sans être capable de gastruler à l'intérieur de l'embryon.

15 Quelques embryons avec le variant (expériences 32 h après l'injection) ressemblent à des gastrulas retardées (50 % d'épibolie).

20 Cependant, aucun d'eux n'exprime de protéine T sous forme d'anneau complet comme on l'observe habituellement dans les gastrulas à 50 % d'épibolie (figure 9B).

25 Les embryons à faible teneur en variant avec un axe réduit, dans la plupart des cas, montrent une expression de protéine T "antérieure" à la formation du tronc de l'axe (figure 10 O), ce qui suggère que la partie antérieure de l'embryon a acquis un caractère postérieur suite à l'expression du variant.

30 Ces résultats permettent de conclure que l'injection d'ARN de variant inhibe de manière efficace l'induction du mésoderme chez les embryons de médaka.

Dans une autre série d'expériences, on a étudié l'effet de l'ARNm du variant sur l'induction neuronale chez le médaka.

On utilise à cet effet un anticorps monoclonal donnant une réaction croisée avec N-CAM de poisson rouge (anticorps monoclonal D3 (10)).

Dans les embryons naturels, D3 détecte l'expression de N-CAM à la surface des cellules du tissu neuronal.

Les résultats obtenus sont donnés sur les figures 10G à 10 O. Les embryons avec des calottes (figures 10G, M, I) n'expriment pas l'antigène MZ15 ou la protéine T mais exprimant une faible teneur en N-CAM dans un petit amas de cellules (voir flèche).

Les embryons avec des calottes avec structure expriment les trois marqueurs de manière désorganisée.

On notera que le marqueur est exprimé à la surface de l'embryon (flèche dans figure 10L). La tête de la flèche dans la figure 10L montre une structure rappelant la carène neurale. Les embryons "à axe réduit" sont donnés sur les figures 10N, O, P.

N-CAM apparaît tout d'abord au stade neurula dans la carène neurale. Dans les embryons plus âgés, le système nerveux central est coloré (figure 10 C, F).

N-CAM est exprimé dans seulement 55 % des embryons à forte teneur en variant (figure 10 I, l'expression de N-CAM est indiquée par la flèche).

Dans les embryons avec le variant, on observe clairement une expression de N-CAM dans les cellules organisées à la manière de tissus (figure 10 M).

Les embryons à faible teneur en variant avec un axe réduit montrent une expression abondante de N-CAM (figure 10P).

Ainsi, bien qu'on observe une expression accrue de N-CAM dans les embryons ayant reçu des injections de faibles quantités d'ARN de variant, l'injection de quantités élevées d'ARN de variant ne conduit pas, comme 5 on aurait pu s'y attendre, à la formation de grande quantité de tissu neuronal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 10 1/ Basler K. et al, Cell, 73, 685-701, 1993.
- 2/ Schmelzer C.H. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1039, 135-141, 1990.
- 3/ Andersson S. et al, J. Biol. Chem. 264:8222-8229, 1989.
- 4/ Sambrook J. et al, Molecular Cloning : A Laboratory 15 Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 5/ Chen C. et al, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752, 1987.
- 6/ Gray K. et al, Proc Natl. Acad. Sci USA 84:6267-6271, 1987.
- 20 7/ Kunkel T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, 1985.
- 8/ Krieg P.A., et al, Nucl. Acids Res. 12:7057-7070, 1984.
- 9/ Sargent T.D. et al, Dev. Biol. 114: 238-246, 1986.
- 25 10/ Zanetti M. et al, J. Cell Biol. 101:53-59, 1985.
- 11/ Schlosshauer B. J. Neurochem 52:82-92, 1989.
- 12/ Blastmeyer M. et al, Development 108:299-311, 1990.
- 13/ Huylebroeck et al, Mol. Endocrinol 4: 1153-1165, 1990.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (INSERM)
(B) RUE: 101 rue de Tolbiac
(C) VILLE: PARIS
(D) PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L' INVENTION: DERIVES DE FACTEURS DE CROISSANCE ET D'HORMONES DE LA SUPERFAMILLE DES TGF β , PROCEDE POUR LEUR OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
(OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 100 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Thr	Asn	Leu	Cys	Cys	Arg	Gln	Gln	Phe	Phe	Ile	Asp	Phe	Arg	Leu	Ile
1															15

Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Tyr
															30
20															

Cys	Glu	Gly	Ser	Cys	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Ala
															45
35															

Ser	Ser	Phe	His	Thr	Ala	Val	Val	Asn	Gln	Tyr	Arg	Met	Arg	Gly	Leu
															60
50															

Asn	Pro	Gly	Thr	Val	Asn	Ser	Cys	Cys	Ile	Pro	Thr	Lys	Leu	Ser	Thr
															80
65															

Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp
85 90 95

Val Pro Asn Met
100

(2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 2:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE

- CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:**
(A) LONGUEUR: 100 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2.

Thr Asn Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe Tyr Ile Asp Phe Arg Leu Ile
1 5 10 15

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr
20 25 30

Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala
35 40 45

Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Val Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr
65 70 75 80

Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp
85 90 95

Val Pro Asn Met

(2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 3:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE

- CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:
(A) LONGUEUR: 100 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3.

Thr Asn Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe Tyr Val Asp Phe Arg Leu Ile
1 5 10 15

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr
20 25 30

Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala
 35 40 45

Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu
 50 55 60

Asn Pro Gly Thr Val Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr
 65 70 75 80

Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp
 85 90 95

Val Pro Asn Met
 100

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 101 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Asn Gly Gly Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe Tyr Ile Asp Phe Arg Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn
 20 25 30

Tyr Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Met Ala Gly Val Pro Gly Ser
 35 40 45

Ala Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly
 50 55 60

Ile Ser Pro Gly Ser Val Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg
 85 90 95

Asp Val Pro Asn Met
 100

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 101 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Asn Gly Gly Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe Tyr Ile Asp Phe Arg Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn
 20 25 30

Tyr Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Phe Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser
 35 40 45

Ala Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly
 50 55 60

Met Ser Pro Gly Thr Ser Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg
 85 90 95

Asp Val Pro Asn Met
 100

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 101 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

His Gly Gly Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe Tyr Ile Asp Phe Arg Ile
 1 5 10 15

Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn
 20 25 30

Tyr Cys Gln Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Met Ala Gly Val Pro Gly Ser
 35 40 45

Ile Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Ile Arg Gly
 50 55 60

Met Asn Thr Gly Ser Val Ser Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg
 85 90 95

Asp Val Pro Asn Met
 100

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 101 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Asn	Gly	Gly	Leu	Cys	Cys	Arg	Gln	Gln	Phe	Tyr	Ile	Asp	Phe	Arg	Leu
1				5						10					15
Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ala Gly Tyr Tyr Gly Asn															
	20				25						30				
Tyr Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Met Ala Gly Val Pro Gly Ser															
	35				40						45				
Ala Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly															
	50				55					60					
Met Ser Pro Gly Ser Val Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser															
	65			70			75			80					
Thr Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Ile Lys Arg															
	85			90						95					
Asp Val Pro Asn Met															
	100														

REVENDICATIONS

1. Dérivés de facteurs de croissance et d'hormones de la superfamille des TGF β , caractérisés en ce qu'il s'agit de variants des produits de type sauvage comportant, dans la partie C-terminale, une ou plusieurs altérations, délétions et/ou mutations, leur conférant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des produits de type sauvage.
5
2. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'il s'agit de variants de facteurs de croissance et d'hormones du groupe comprenant les TGF β , activines, protéines BMP, inhibines, hormones antimullériennes, dorsalines.
10
3. Dérivés selon la revendication 2, caractérisés en ce que les facteurs de croissance et hormones sont d'origine animale ou humaine.
15
4. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de la partie N-terminale.
20
5. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que l'altération, mutation ou délétion, de la partie C-terminale concerne au moins un acide aminé conservé dans tous les membres de la superfamille ou tout au moins dans pratiquement tous les membres.
25
6. Dérivés selon la revendication 5 dans lesquels l'altération concerne un groupe phénylalanine du produit de type sauvage.
30
7. Dérivés selon la revendication 6, caractérisés en ce que le motif phénylalanine est remplacé par un motif isoleucine, alanine ou sérine, ou est déleté.

8. Dérivés selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'il s'agit de variants d'activine β A, β B ou β AB.

5 9. Dérivés selon la revendication 8, caractérisés en ce qu'il s'agit de variants d'activine de poisson β B dans lesquels le motif phénylalanine en position 21 est remplacé par un motif isoleucine.

10 10. Clones d'ADN ou d'ARN, caractérisés en ce qu'ils sont capables de coder ou de transcrire pour les séquences d'acides aminés des variants selon l'une des revendications 1 à 9.

15 11. Molécules d'ADN ou d'ARN capables de s'hybrider avec celles portant l'information génétique pour coder pour les variants selon l'une des revendications 1 à 9.

12. Molécule d'ADN ou d'ARN capable de coder pour le variant selon la revendication 9.

20 13. Vecteurs recombinants d'expression ou de transcription, caractérisés en ce qu'ils renferment au moins une partie des séquences d'ADN ou d'ARN selon les revendications 10 à 12, sous le contrôle d'un promoteur.

14. Les cellules hôtes transformées par les vecteurs selon la revendication 13.

25 15. Procédé d'obtention des variants selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par la mise en œuvre de techniques de synthèse peptidique, comprenant l'enchaînement d'acides aminés donnés, dans l'ordre souhaité, ou en variante, par recombinaison génétique, comprenant l'utilisation d'une séquence d'ADN 30 mutée, comportant l'information génétique pour coder pour la séquence d'acides aminés recherchée, l'insertion de cette séquence dans un vecteur, l'expression du vecteur dans une cellule hôte et la récupération du variant

exprimé, soumis si on le désire à au moins une étape de purification.

5 16. Application des variants selon l'une des revendications 1 à 9 en tant qu'inhibiteurs des facteurs de croissance et hormones correspondants naturels.

10 17. Application selon la revendication 16 pour des études fonctionnelles de facteurs de croissance et hormones de la superfamille des TGF β .

18. Application selon la revendication 16, comme agents thérapeutiques pour réguler et/ou contrôler la surexpression d'une hormone ou d'un facteur de croissance.

19. Application selon la revendication 16, comme compositions contraceptives.

15 20. Application selon la revendication 16, pour le contrôle de la régulation hormonale de la différenciation érythrocytaire.

20 21. Application selon la revendication 16, dans des processus cicatriciels ou pour bloquer la morphogénèse osseuse.

22. Application selon la revendication 16, comme modèle de culture cellulaire, par exemple pour le contrôle de la survie neuronale.

1/7

Figure 1

M .TNLCCRQQI'FIDRLLIGNDWIAPTYGGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFLITAVVNQYRMRGGLNPTKLVNSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPM
X1 Y A
X2 YY A
R1 NGG Y A A
R2 NGG Y A A
M IGG Y I F
d NGG Y A M
A A M T S S
I MS S

2720069

2/7

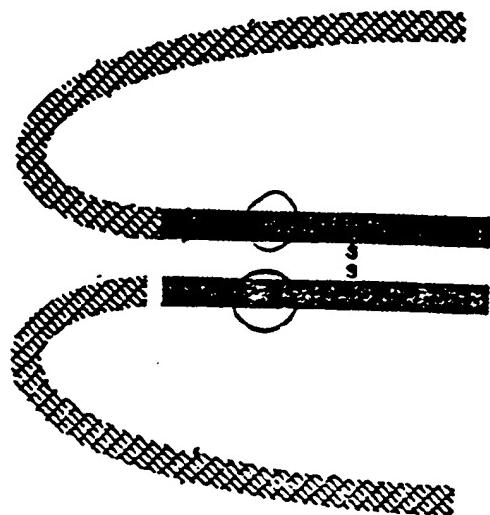


Figure 2

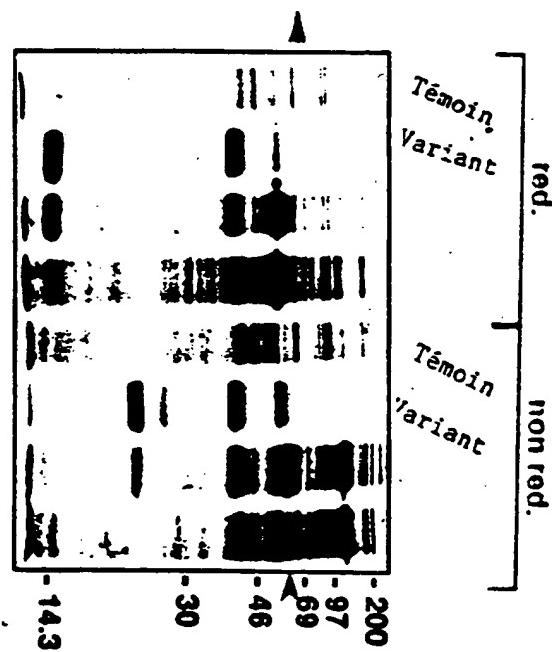


Figure 3

3/7

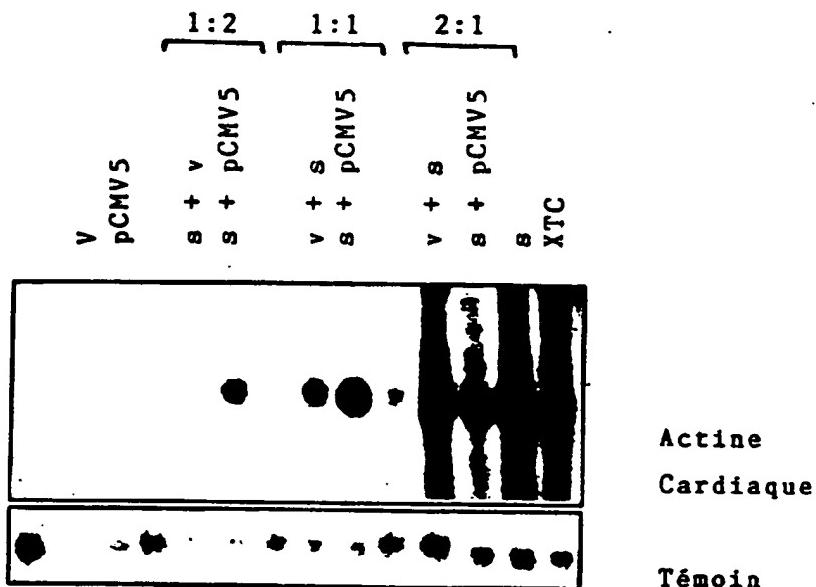


Figure 4

A

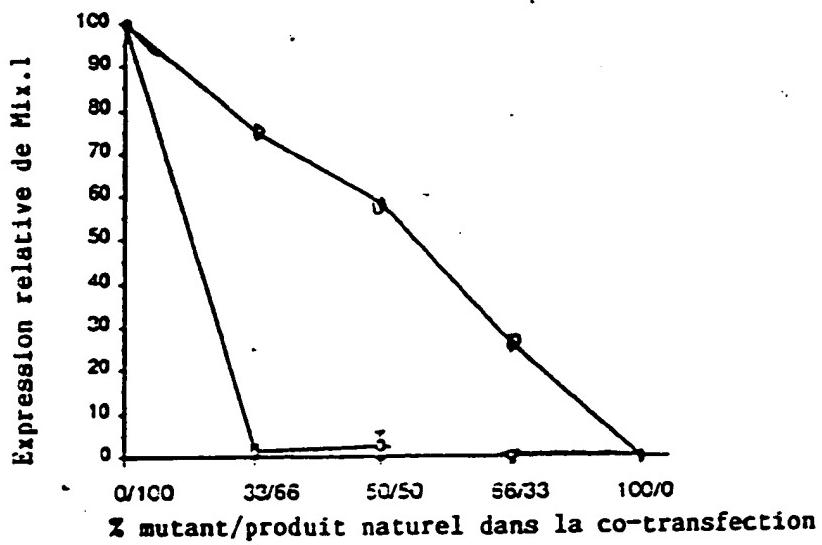
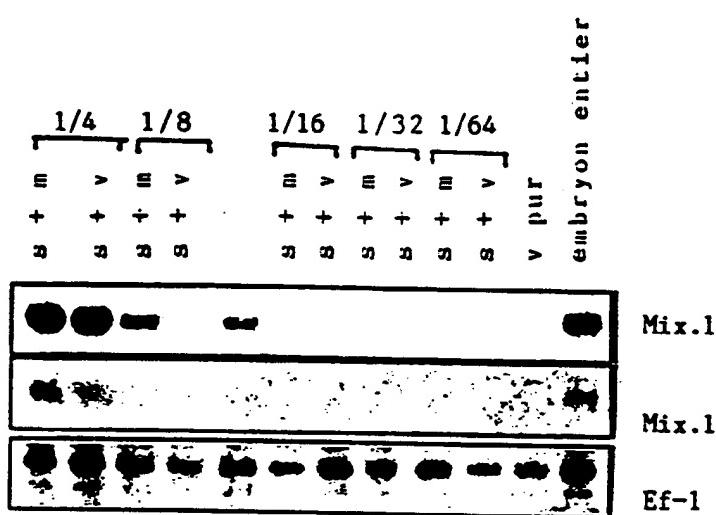


Figure 5

4/7

Figure 6



C

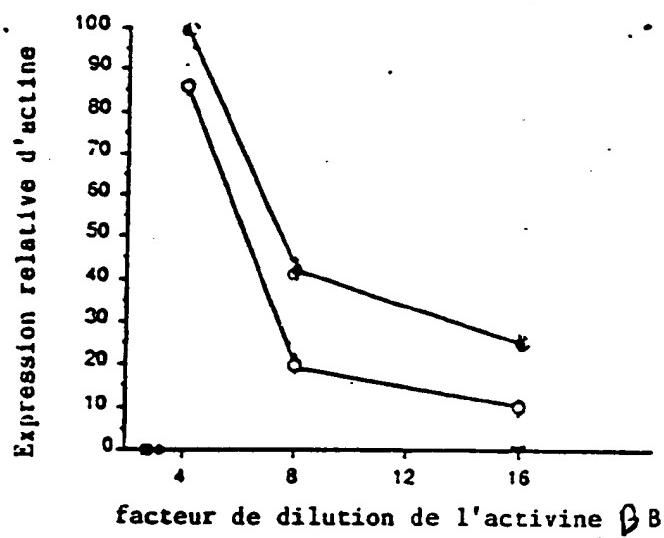


Figure 7

5/7

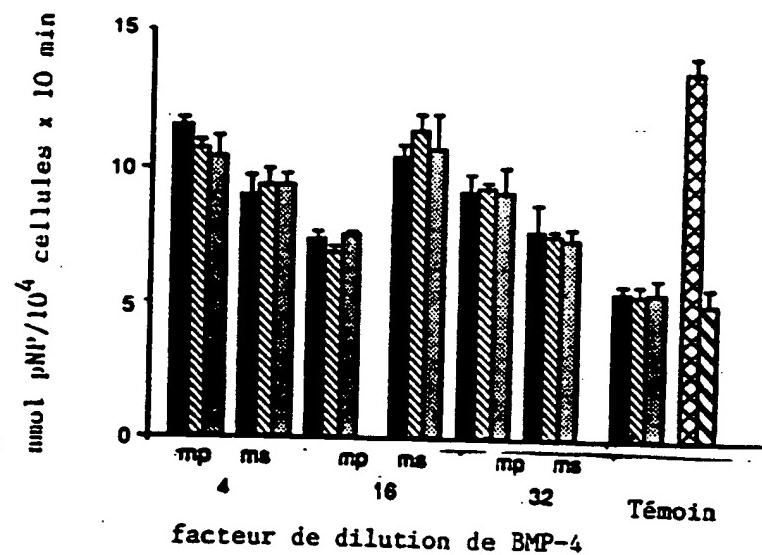


Figure 8

2720069

6/7

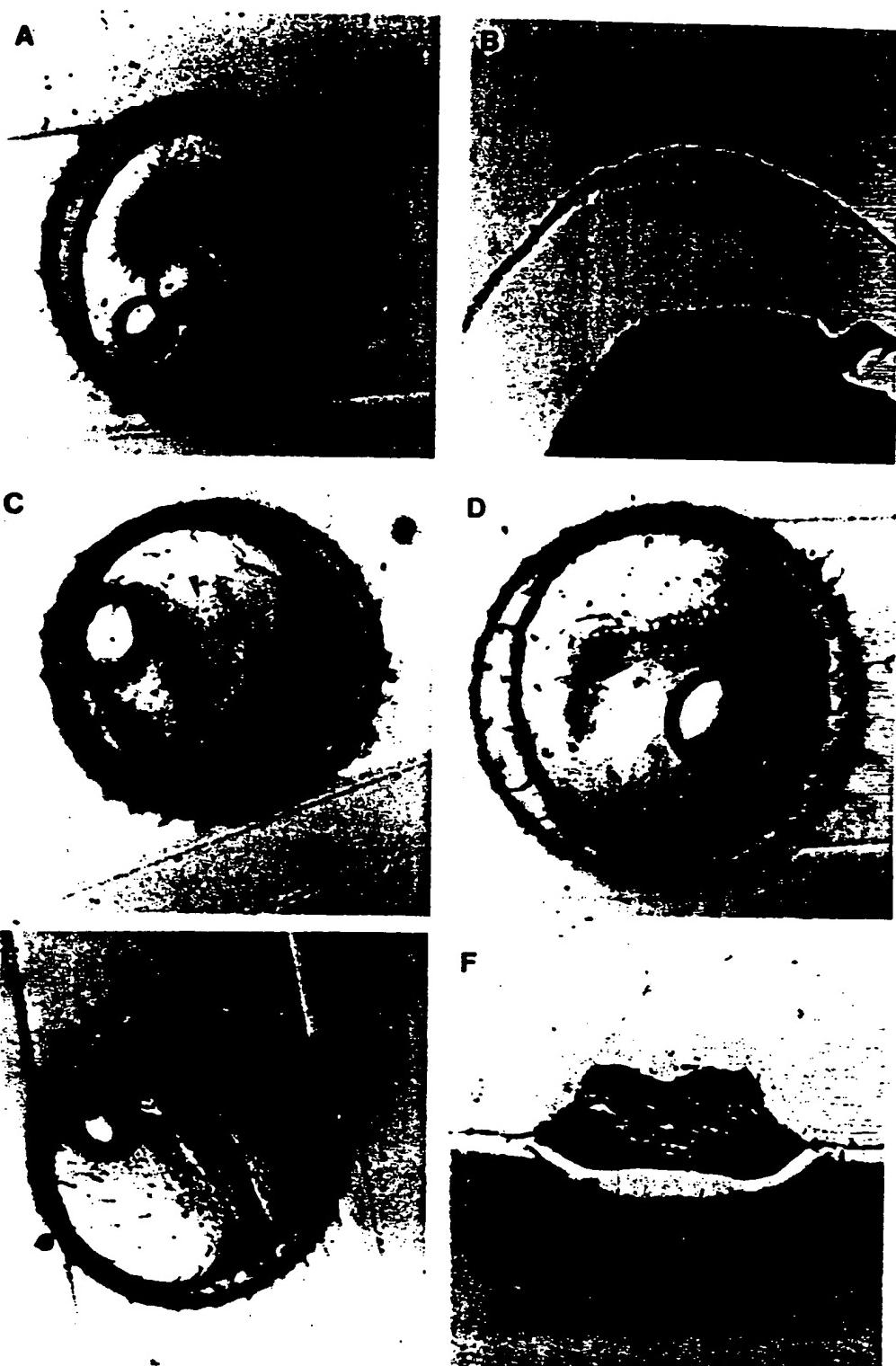
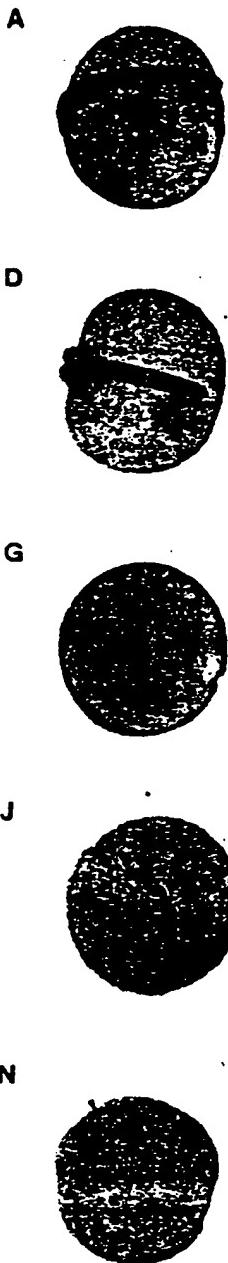
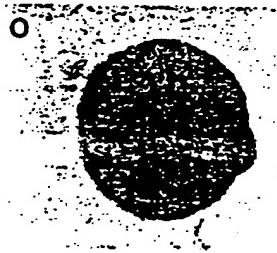
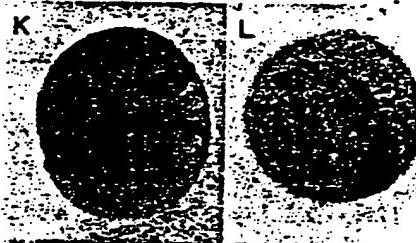
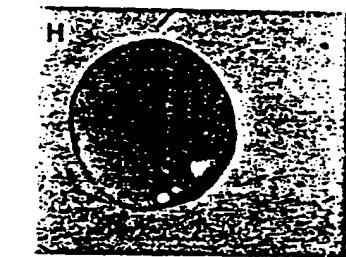
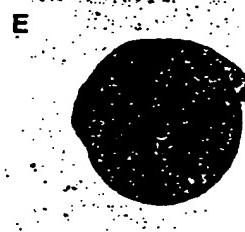
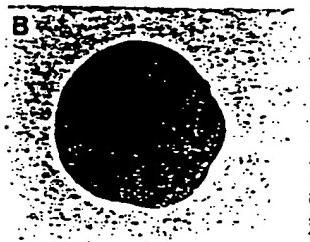
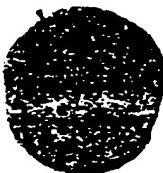
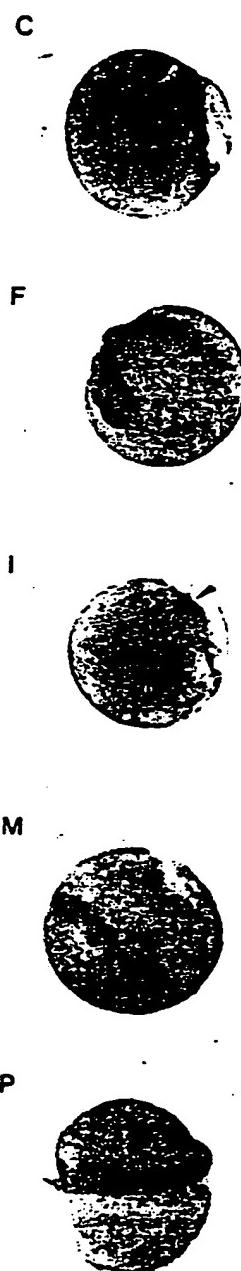


Figure 9

7/7

MZ 15**T****N****D3**

WT-control

50n Ig

10n Ig

2.5 nIg

Figure 10

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2720069

N° d'enregistrement
nationalFA 500045
FR 9406135

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
X	EP-A-0 222 491 (GENENTECH INC.) * colonne 7, alinéa 4 - colonne 11, alinéa 1 * * colonne 12, alinéa 3 * * colonne 25, alinéa 4 *	1-19
Y	---	20-22
X	US-A-5 284 763 (R.M.A.DERYNK ET AL.) * colonne 8, alinéa 3 - colonne 9, alinéa 4 * * colonne 10, alinéa 3 - colonne 11, alinéa 1 * * colonne 2, alinéa 2 -alinéa 4 *	1-3,5,6, 10-17
A	EP-A-0 268 561 (SANDOZ-ERFINDUNGEN G.M.B.H.) * colonne 14, ligne 61 - colonne 15, ligne 7 *	1-3
Y	WO-A-92 20793 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) * abrégé; revendication 6 * * page 2, ligne 1 - ligne 21 * ---	20,22
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9022, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 90-167904 & JP-A-2 108 627 (AJINOMOTO KK) 20 Avril 1990 * abrégé *	21

2

FORM 10000 (PCT/2000)

Date d'achèvement de la recherche

23 Février 1995

Examinateur

Gurdjian, D

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

- X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou antérieure technologique générale
O : divulgué sous forme
P : document intercalaire

- T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

- A : membre de la même famille, document correspondant